

(54) MEMBRANE CARRIER FOR IMMOBILIZING PROTEIN AND ITS PREPARATION

- (11) 60-91983 (A) (43) 23.5.1985 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-199856 (22) 25.10.1983
 (71) SUSUMU KOGYO K.K.(1) (72) KAZUO HORIGUCHI(1)
 (51) Int. Cl. C12N11/08//B29C71/04,C08J7/00,C12Q1/00,G01N27/40,G01N33/545

PURPOSE: To obtain the titled membrane carrier suppressing nonspecific adsorption of protein, by making the surface of high polymer membrane into ash with low-temperature plasma of oxygen or oxygen-containing gas.

CONSTITUTION: A porous high polymer membrane (e.g., polypropylene, etc., preferably 25~100 μ m membrane thickness) having constituent elements comprising carbon, hydrogen, and, if necessary, oxygen, is placed on an electrode of a plasma generator, it is discharged in an atmosphere of oxygen or an oxygen-containing gas under reduced pressure (preferably 0.15~1Torr) between the electrodes to produce vapor plasma, so that the high polymer membrane is processed into ash from the surface to give the desired membrane carrier. In the operation, preferably at least 20% thickness is reduced by ash formation.

(54) NOVEL PLASMID VECTOR

- (11) 60-91984 (A) (43) 23.5.1985 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-198043 (22) 22.10.1983
 (71) GAKUZOU TAMURA (72) GAKUZOU TAMURA(3)
 (51) Int. Cl. C12N15/00,C12N1/00//(C12N1/00,C12R1:19)

NEW MATERIAL: A plasmid vector capable of being packaged as particles like single stranded phase by superinfection of helper phage.

USE: A template for rearranging position of inserted gene for sequence participating transfer, translation and secretion by site-specific deletion using synthetic oligonucleotide.

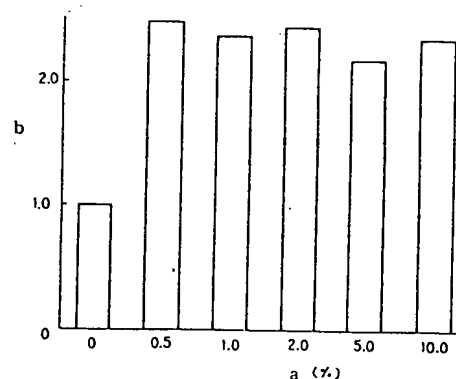
PREPARATION: M13mp10RF-DNA is scissored by a combination of restricted enzymes, multilinker sequence is taken out, and introduced into pTA 529. sfp region of single stranded phase, namely, RsaI fragment containing origin of c-strand DNA replication, origin of v-stranded DNA replication, and origin of packaging is introduced to pYK330 by blunt-end. Escherichia coli YK660 (F 196+) is transformed with recombinant DNA having RsaI fragment inserted into pYK330, and infected by wild-type fd phage, etc.

(54) CELL FUSION

- (11) 60-91985 (A) (43) 23.5.1985 (19) JP
 (21) Appl. No. 58-199929 (22) 27.10.1983
 (71) NITSUSUI SEIYAKU K.K. (72) NORITSUGU YABE(2)
 (51) Int. Cl. C12N15/00

PURPOSE: To subject a splenocyte immunized with an antigen and a myeloma cell to cell fusion in high probability in high reproducibility, by pretreating them with a specific sucrose derivative or dextrin, carrying out cell fusion with polyethylene glycol.

CONSTITUTION: Before a splenocyte and a myeloma cell are treated with polyethylene glycol, they are treated with a sucrose derivative obtained by treating sucrose with epichlorohydrin or dextrin. CRP, insulin, alpha-fetoprotein, ferritin, and other protein antigen are used as an antigen to immunize the splenocyte.



a: concentration of sucrose derivative (%), b: antibody yield efficiency (average value of enhancement index experiments of three times)

⑩ 日本国特許庁(J.P.)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-91983

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)5月23日

// C 12 N 11/08
B 29 C 71/04
C 08 J 7/00
C 12 Q 1/00
G 01 N 27/40
33/545

7421-4B
8117-4F

8213-4B
7363-2G
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑮ 発明の名称 タンパク質固定用膜担体およびその製造方法

⑯ 特 願 昭58-199856

⑰ 出 願 昭58(1983)10月25日

⑱ 発 明 者 堀 口 和 男 京都市南区上鳥羽馬廻し町14 進工業株式会社内
⑲ 発 明 者 宇 尾 淳 子 京都市左京区修学院中林町79
⑳ 出 願 人 進 工 業 株 式 有 限 公 司 京都市南区上鳥羽馬廻し町14
㉑ 出 願 人 塩野義製薬株式会社 大阪市東区道修町3丁目12番地
㉒ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

タンパク質固定用膜担体およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 酸素または酸素を含む気体の低温プラズマにより処理され、表面からプラズマ灰化された高分子膜から成るタンパク質固定用膜担体。

2. 高分子膜が多孔性である特許請求の範囲第1項記載の膜担体。

3. 高分子膜が構成元素として炭素、水素および必要すれば酸素からなる特許請求の範囲第1項または第2項記載の膜担体。

4. 高分子膜がポリオレフィンから成る特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の膜担体。

5. ポリオレフィンがポリプロピレンである特許請求の範囲第4項記載の膜担体。

6. 処理前の高分子膜の厚さが25～100μmであり、処理後の高分子膜の厚さが少くとも15μmである特許請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の膜担体。

7. 酸素または酸素を含む気体の低温プラズマにより高分子膜を処理して高分子膜を表面からプラズマ灰化することを特徴とするタンパク質固定用膜担体の製造方法。

8. 酸素の低温プラズマにより処理を行う特許請求の範囲第7項記載の製造方法。

9. 低温プラズマ処理を0.15～1 Torrの圧力下で行う特許請求の範囲第7項または第8項記載の製造方法。

10. 高分子膜の厚みを灰化して少くとも20%減少させる特許請求の範囲第7～9項のいずれかに記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、タンパク質固定用膜担体およびその製造方法に関し、更に詳しくは、表面が低温プラズマ処理により灰化され、タンパク質の非特異的吸着が抑制されたタンパク質固定用膜担体およびその製造方法に関する。

人間の体液や組織中の化学物質を分析して疾患の予防、診断、治療を助ける為に臨床分析(検査)

が行われる。臨床分析には、微量で分析できること、簡便かつ迅速に行えること、正確であることなどの要求条件がある。

酵素は、高い基質特異性や温和な条件下での反応加速など、他の化学試薬にない特徴を有している。臨床分析に広く利用されるようになっていく。しかし、遊離酵素は、値段が高くしかも安定性に欠ける為、酵素は一般に高分子材料に固定化されて用いられる。

また、最近生体の微量成分の臨床分析の一方法として免疫測定法が採用される様になった。この方法においても、免疫反応に関与する抗原または抗体は担体に固定化して用いる。

この様に酵素、抗原、抗体をはじめとするタンパク質を担体に固定化する場合に重要なことは、

- (1) 担体に結合固定化されるタンパク質の密度が高いこと、
- (2) 抗原抗体反応においては、この反応による結合以外の非特異的吸着が少ないこと、
- (3) 更に、担体が膜であり、固定化膜を種々の

電極と組み合わせて酵素電極法で測定する場合、酵素と基質との反応生成物の膜透過速度が大きいことなどである。

膜担体の従来の主な製造方法は、キャストイング法である(S. Kato, M. Aizawa, S. Suzuki J. Membr. Sci., 3, 29(1978)および N. Weliky, H. H. Weetall, Immunochimistry, 2, 293(1965)など参照)。しかし、キャストイング法では、膜の製造に熟練を要し、また再現性も悪い。

本発明者らは、タンパク質固定用膜担体を簡単にかつ経済的に提供すべく研究を重ねた結果、高分子膜を低温プラズマで処理することにより膜表面を灰化すると、タンパク質の非特異的吸着の抑制された膜担体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の一要旨は、酸素または酸素を含む気体の低温プラズマにより処理され、表面からプラズマ灰化された高分子膜から成るタンパク質固定用膜担体に存する。

本発明の膜担体は、無孔膜または多孔性膜のいずれであってもよいが、酵素電極法に用いる場合は、多孔性でなければならない。多孔性の場合、孔径は少なくとも250Åであるのが好ましい。

膜厚は、特に制限されないが、処理前の厚さは100μmを超えないのが好ましい。これより厚くなると、多孔性膜の場合、孔壁まで十分にプラズマ灰化するのに時間がかかり不利である。一方、膜が薄すぎると取り扱いに不便であり、少なくとも25μmの厚さが好ましい。処理後の厚さは、自立性膜を得るには約15μm以上が好ましいが、別の支持材料を用いる場合には、これより薄くてもよい。

高分子膜は、構成元素として炭素、水素および必要すれば酸素とからなり、取り扱い上支障のない機械的強さを持つ高分子材料からなる膜であれば使用できる。好ましい例として、ポリオレフィン、特にポリプロピレン、およびポリカーボネートなどが挙げられる。

本発明の膜担体は、既知のプラズマ発生装置を

用いて低温プラズマ処理することにより製造することができる。すなわち、プラズマ発生装置の電極上に高分子膜を置き、酸素または酸素を含む気体の雰囲気中減圧下に電極間に放電させることにより気体プラズマを発生させて高分子膜を表面から灰化する。

酸素はベリウムなどで希釈して用いてもよいが、一般に純酸素が好ましい。

圧力は、0.15~1 Torrが一般に採用される。圧力が0.15 Torrより低いと放電により高電圧を必要とし、また1 Torrより高いと放電が困難となる。

電流密度は、0.05~0.5 mA/cm²である。

処理時間は、その他の条件に依存するが、多孔性膜の場合、孔壁の表面をも十分に灰化するには膜厚の少なくとも20%が灰化により減少する様に定める。

プラズマ灰化は、片面から行ってもよいが、性能の良い膜担体を得るには両面から行うのが好ましい。

プラズマ灰化された膜表面にはアルデヒド基が形成されるので、シッフ試薬により染色して灰化処理の確認を行うことができる。

本発明の低温プラズマ処理された膜担体では、表面の水に対するぬれが非常によくなり、いわゆる拡張ぬれの状態となる。従って、酵素電極法に用いると測定用の電極に対する接触の均一性や基質液に対するなじみがよくなり、酵素反応が円滑に進行する。また、プラズマ灰化により実質的に膜厚を減少させることができ、これにより表面を粗面化し、表面積を増大させることができるので、たとえば固定化酵素、抗体、抗原または受容体の密度を高め、測定の感度を向上させることができる。また、膜厚の減少は、酵素反応で生成する物質の膜透過を容易にし、測定感度の向上がはかれる。

本発明に従った低温プラズマによる膜の表面灰化によって生じる膜表面の変化の重要な特徴は、たんぱく質、特に免疫測定に際して用いられる酵素標識抗原などの非特異性吸着が非常に少なくな

ることである。これにより測定のバックグラウンドノイズを低く保ち、測定の精度を向上させることができる。

さらに、本発明によれば、非常に簡単にかつ再現性よく膜担体を製造でき、かつ市販の高分子膜をそのまま使用するため、量産性にすぐれている。

次に実施例を示し、本発明を具体的に説明する。

実施例1

ポリプロピレン膜(商品名:ジュラガード#3401、ポリプラスチック株式会社製)を $300\text{mm}\phi \times 500\text{mm}$ ガラス製の平行平板型プラズマ反応器のアルミニウム電極板にはりつけ、 0.001Torr 以下に排気した後、酸素ガスを導入し、排気しながら 0.3Torr 、 100mA ($0.14\text{A}/\text{cm}^2$)(5KHz)、 350V の条件で放電させ、5分毎にサンプルを切り取りながら、計30分間処理した。

両面処理は、5分ずつ裏返して合計15分ずつプラズマ処理に付した。

各時間毎に取り出したサンプルを5等分して測

定サンプル各5枚をつくった。

測定サンプルを蒸留水中に浸漬した後、取り出し、過酸化水素電極にセットし、これを 30mM の緩衝液(PBS)に入れて(25°C 、 300rpm かきまぜ)白金電極に $+0.65\text{V D.C.}$ を印加して安定させたのち、 0.03% 過酸化水素 0.5mM を添加して流れる電流を測定、記録した。

片面処理および両面処理の結果を第1表に示す。

第1表

処理時間 (分)	H_2O_2 透過出力電流*($\times 100\text{mA}$)	
	片面処理	両面処理
0	46.0	45.2
5	49.2	56.8
10	52.2	64.2
15	53.2	70.8
20	58.0	—
25	61.2	—
30	69.0	99.8

注1) 5回の平均。ただし、両面30分処理では1枚破損の為、4回の平均。

この結果を第1図のグラフに示す。

両面30分処理した膜については重量変化を測定した。ポリプロピレン膜を蒸留水で浸漬洗いした後、風乾し、秤量した。上記と同様にプラズマ処理した後、再び秤量した。重量減少(%)を求め、処理前の膜厚 $25\mu\text{m}$ から処理後の膜厚を計算により求めた。

処理前 処理後 減少量

サンプル1: 0.24775g 0.15400g 0.09375g (37.8%)

サンプル2: 0.21250g 0.14610g 0.06640g (31.2%)

処理後の膜厚

サンプル1: $25 - (25 \times 0.387) = 15.5\mu\text{m}$

サンプル2: $25 - (25 \times 0.312) = 17.2\mu\text{m}$

実施例2および比較例1

ポリプロピレン膜(ジュラガード#3401、 $20 \times 20\text{cm}$ 角)を、実施例1と同様の条件で15分間酸素プラズマ処理した。処理前後の重量変化から、膜厚は処理前の $25\mu\text{m}$ から $18\mu\text{m}$ に

特開昭60- 91983 (4)

白金電極に+0.65V D.C.印加、安定させたのち、20mgのグルコースを添加して流れる電流を測定した値である。

減少していることがわかった。膜表面の光沢は消失し、水滴を表面に落すと完全に濡れ、吸収されてしまった。

このようにして得られた酸素プラズマ灰化処理膜と未処理膜を、グルコースオキシダーゼで標識したインシュリン液に25℃で90分間浸漬した後、緩衝液で洗浄した。

各々の膜を過酸化水素電極にセットし、膜のグルコースオキシダーゼ活性を測定した。

その結果、未処理のポリプロピレン膜におけるグルコースオキシダーゼ(COD)活性にもとづく出力電流は1200nAであったのに対し、本発明に従い15分間処理した膜では、わずかに50nAにすぎなかった。プラズマ処理時間15分までの途中のサンプルの測定値を表2および第2図に示す。なお、吸着による膜のCOD活性にもとづく電流は、サンプルをCODで標識したインシュリン液中で25℃、90分処理後、緩衝液(PBS)で4回洗浄したのち、過酸化水素電極にセットし、これを30mlのPBS中に漬けて、その

本発明に従い処理した膜の表面は、シッフ試薬により赤紫色に染まることが確認された。このことは、膜表面に第1アミンと結合するアルデヒド基が存在することを示唆している。

実施例3

酸素プラズマによる表面灰化処理(15分間処理)膜を、2.5%オクタノチレンジアミン水溶液中で25℃、90分間かきませ、蒸留水で3回洗浄し、次いで2.5%グルタルアルデヒド水溶液中で25℃、90分間かきませた後、蒸留水で十分洗浄して後処理した。

この様に後処理した膜と、実施例2で得た膜(15分間処理)について、固定化する成分としてグルコースオキシダーゼで標識したヒトアルブミン液を用いて、25℃で90分間固定化処理を行った。

緩衝液で十分洗った後、各々を過酸化水素電極にセットし、膜に結合したグルコースオキシダーゼ標識ヒトアルブミンの量をグルコースオキシダーゼ活性にもとづく出力電流として測定したとこ

表 2

処理時間(分)	赤外線吸収スペクトル(710nm)における吸収電圧(mV)	吸着による膜のCOD活性にもとづく出力電流(nA)	
		(未処理)	(処理)
0	0	1200	
2.5	7.5	640	
5	17.5	265	
10	29.0	60	
15	46.0	50	

ろ、後処理をしない膜では22 nA であつたのに対し、後処理をした膜では9990 nA に達した。

後処理をしない膜での値は、非特異的吸着によるものであり、この値(22 nA)に対し、固定化量は出力電力で比較すると約500倍に達した。

4. 図面の簡単な説明

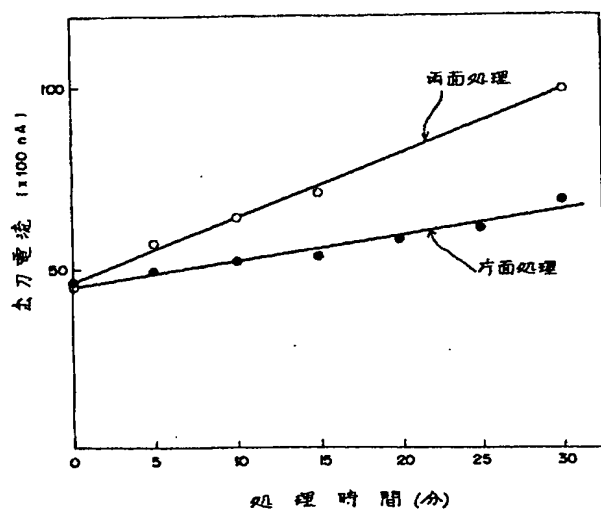
第1図は、実施例1の結果を示すグラフ、

第2図は、実施例2の結果を示すグラフである。

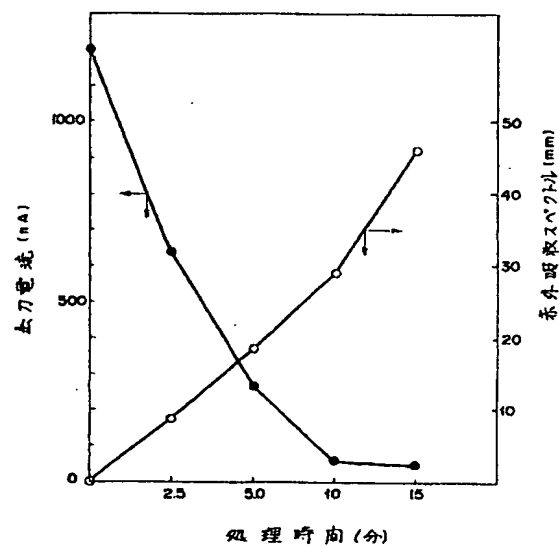
特許出願人 進工業株式会社 (外1名)

代理人 弁理士 青山 藤 (外2名)

第1図



第2図

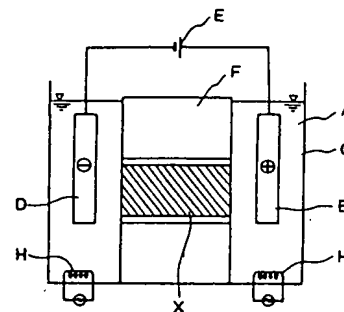


(54) TESTING METHOD FOR DETERIORATION ACCELERATION OF CONCRETE

(11) 4-19560 (A) (43) 23.1.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-121082 (22) 14.5.1990
 (71) OHBAYASHI CORP (72) DAIZO KIDA(1)
 (51) Int. Cl.⁵. G01N33/38, G01N17/02//G01N27/26

PURPOSE: To obtain a sufficient acceleration extent by dipping the concrete to be tested in an electrolyte, installing a couple of electrode on both sides of the concrete, and applying a DC voltage between those electrodes and dissolving calcium ions out of the concrete in the electrolyte.

CONSTITUTION: The couple of electrode plates B and D are provided opposite the exposed surfaces of the body X to be tested; and one electrode plate B is connected to the positive electrode side of a DC power source E, and the other electrode D is connected to the negative electrode side of the DC power source E. When the DC voltage is applied between the electrodes B and D, an electric field is produced in the electrolyte where the concrete is dipped and calcium ions in the concrete are charged electrostatically to the positive polarity, so they are attracted to the negative electrode side and dissolved out in the electrolyte. The current dissolving-out extent is almost proportional to the DC voltage between the electrodes, so the extent of the dissolution of the calcium ions, i.e. the acceleration of the test can easily be varied by adjusting the level of the DC voltage between the electrodes.

**(54) BLOCKING AGENT FOR IMMUNOASSAY**

(11) 4-19561 (A) (43) 23.1.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-121261 (22) 14.5.1990
 (71) NIPPON SHOKUBAI KAGAKU KOGYO CO LTD (72) KOICHI SAKANO(1)
 (51) Int. Cl.⁵. G01N33/531

PURPOSE: To allow preservation at ordinary temp. and autoclave sterilization without rotting and to obviate the generation of the nonspecific adsorption to various kinds of sera by using polyvinyl alcohol (PVA).

CONSTITUTION: The PVA has 200 to 3,000 degree of polymn. and 75 to 99.9% rate of saponification and the concn. thereof is 0.01 to 20%. This PVA is used by being dissolved in a solvent at the time of the use thereof. The solvent includes water, phosphoric acid buffer soln., etc., and the upper limit of the concn. to these solns. is the saturation solubility. The immunoassay includes enzyme immunoassay, etc. After the antigens to be analyzed are adsorbed to a solid base, such as plastic plate, the blocking agent is adsorbed thereon and the serum or the like to be measured diluted by a diluting liquid is added thereto. The antibodies in the serum are conjugated with the antigens fixed to the solid base and a liquid prepd. by diluting a labeling antibody to be conjugated is added to this conjugate and further, a substrate is added thereto. The absorbed light, fluorescence and emitted light are measured, by which the measurement is made.

(54) DILUENT FOR IMMUNOASSAY

(11) 4-19562 (A) (43) 23.1.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-121262 (22) 14.5.1990
 (71) NIPPON SHOKUBAI KAGAKU KOGYO CO LTD (72) KOICHI SAKANO(1)
 (51) Int. Cl.⁵. G01N33/531

PURPOSE: To allow preservation at ordinary temp. and autoclave sterilization without rotting and to provide the excellent diluent which suppresses the nonspecific reaction with various kinds of sera and antibodies by using polyvinyl alcohol (PVA).

CONSTITUTION: The average degree of polymn. of the PVA is usually 100 to 10,000, more preferably 200 to 3,000. The rate of saponification thereof is usually 50 to 99.9%, more preferably 70 to 99.9%. The concn. at the time of using this PVA as the component in the diluent is usually 0.01 to 20%, more preferably 0.05 to 10%. The PVA is used by being dissolved in a solvent at the time of using the PVA and the solvent includes water, etc. The immunoassay includes enzyme immunoassay, etc. After the antigens to be analyzed are adsorbed to a solid base, such as plastic plate, the blocking agent is adsorbed thereon and the serum or the like diluted by the diluent is added thereto to conjugate the antibodies in the serum with the antigens fixed to the solid base. The liquid prepd. by diluting a labeling antibody to be conjugated is added to this conjugate and further, a substrate is added thereto. The absorbed light, fluorescence and emitted light are measured.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-19561

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)1月23日

G 01 N 33/531

B

7906-2J

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 免疫アッセイ用ブロッキング剤

⑯ 特 願 平2-121261

⑰ 出 願 平2(1990)5月14日

⑱ 発 明 者 阪 野 公 一 茨城県つくば市観音台1-25-12 日本触媒化学工業株式会社筑波研究所内

⑲ 発 明 者 松 山 浩 文 茨城県つくば市観音台1-25-12 日本触媒化学工業株式会社筑波研究所内

⑳ 出 願 人 日本触媒化学工業株式会社 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

免疫アッセイ用ブロッキング剤

2. 特許請求の範囲

1. ポリビニールアルコールを含有して成る免疫アッセイ用ブロッキング剤。

2. ポリビニールアルコールが重合度200～3000、及び鹸化度75～99.9%を有する請求項1に記載の免疫アッセイ用ブロッキング剤。

3. ポリビニールアルコール濃度が0.01～20%である請求項1に記載の免疫アッセイ用ブロッキング剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の技術〕

本発明は、免疫アッセイ用ブロッキング剤、さらに詳しくは長時間の常温保存が可能で、各種血清と非特異的吸着を起こし難い免疫アッセイ用ブロッキング剤に関するものである。

〔従来の技術〕

近年、免疫測定法が広く用いられるようになり、人の臨床検査や診断、動物の病気の診断または多くの分野の研究に應用されている。この免疫測定法、たとえば酵素免疫測定法やラジオイムノアッセイでは、固体支持体、例えばポリスチレン等のマイクロプレートに抗原、抗体等を固定しておき、この固体支持体を、分析対象としての抗体、抗原等を含有する分析試料と接触せしめることにより固体支持体に固定された抗原、抗体等と分析試料中の抗体、抗原等とを特異的に結合せしめるが、この場合固体支持体表面上に存在する遊離結合部位と分析試料中の分析対象とが非特異的に結合し、これが測定誤差の原因となる。このため、抗原や抗体をプレートに固定した後ブロッキング剤で固体支持体をコーティングして前記遊離部位をブロックすることにより非特異的吸着を防止し、測定を行っている。この測定に使用される代表的なブロッキング剤として、従来から牛血清アルブミン、卵アルブミン、ゼラチン、スキムミルク等が挙げ

られる。しかしながらこれらのブロッキング剤は天然物であるため腐敗しやすく、そのため低温保存が必要であったり、ろ過滅菌等の滅菌が必要であり、長時間常温で保存するには適さない。また上記ブロッキング剤は、ある種の分析試料、例えば鶏血清中の種々の抗体と非特異的に結合するため、このような試料の分析においてはブロッキング剤と試料中の成分との非特異的結合が分析誤差の原因となる。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って、本発明は、腐敗せず長期間の保存および滅菌操作が簡単で、各種血清と非特異吸着を起こさない優れたブロッキング剤を提供するものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究の結果、免疫アッセイ用ブロッキング剤としてポリビニールアルコールを用いることにより、

イムノアッセイ法、蛍光免疫アッセイ法、発光免疫アッセイ法、ラテックス凝集法等があげられる。例えば酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、及び発光免疫測定法では、プラスチックプレート、プラスチックビーズ等の固体支持体に対象となる抗原を吸着したのちブロッキング剤を吸着させ、これに希釈剤で希釈した測定対象の血清等を加え、固体支持体に固定された抗原に血清中の抗体を結合させ、この抗体に結合する標識抗体を希釈剤で希釈した液を加え、さらに基質を加え、吸光、蛍光、発光を測定することにより測定がなされる。ラジオイムノアッセイ法では、プラスチックプレートやプラスチックビーズに対象となる抗原を吸着した後ブロッキング剤を吸着させ、これに血清希釈剤で希釈した測定対象の血清を加え抗原に抗体に結合させ、抗体に結合するラジオアイソトープ標識抗体を希釈剤で希釈した液を加え、結合したラジオアイソトープ量を測定する。ラテックス凝集法ではラテックス微粒子に抗原を吸着したのちブロッキング剤を吸着させこれに希釈剤で希釈した

上記課題が達成されることを見だし本発明を完成するに至ったのである。すなわち、ポリビニールアルコールよりなる免疫アッセイ用ブロッキング剤に関するものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に関わるポリビニールアルコール（以下「PVA」と略す）としては、通常平均重合度が100～10000、好ましくは200～3000である。またPVAの鹸化度は通常50%～99.9%、好ましくは、70%～99.9%である。また、このPVAをブロッキング剤として使うときの濃度としては、通常0.01%～20%、好ましくは、0.05～10%である。ただし、PVAの分子量が大きくなると水に対する溶解性が悪くなり、溶解度が5%に満たないものがあるので、これらの濃度の上限は飽和溶解度とする。このPVAを使用する際、溶媒に溶解して用いられるが、その溶媒としては、水、磷酸緩衝液、磷酸緩衝生理食塩水等があり、又これらの液に対する濃度の上限は飽和溶解度である。

免疫測定法としては、酵素免疫測定法、ラジオ

測定対象の血清を加え、凝集の変化を見ることにより診断する。

この測定対象としては、組織、細胞、細菌、かび、マイコプラズマ、ウイルス、デオキシリボ核酸、タンパク質、多糖、脂質、タンパク質に結合した各種ハプテン（抗生物質、ホルモン等の低分子化合物）等を用いることが出来る。血清としては、人、馬、牛、豚、羊、山羊、兎、鶏、犬、猫、ラット、マウス等の血清が利用できる。この中でもとりわけブロッキング剤との非特異反応の出やすい鶏からの血清による病気の診断に有用であり、たとえば鶏アデノウイルス、鶏痘ウイルス、伝染性ファルックスキー瘰癧ウイルス、伝染性気管支炎ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス、鶏インフルエンザウイルス、マレック病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パラミクソ病ウイルス、鶏レオウイルス、ロタウイルス、クラミジア、ポルデチーラ、細胞内皮腫症ウイルス、鶏白血病ラレスピスツエラ、マイコプラズマ、サルモネラ、腫瘍、コクシジウム、ロイコチトゾーンあげられ

る。人では各種血清診断等またはその他動物の診断として牛の病気で、イバラキ病、伝染性鼻管炎、アデノウイルス感染症、流行熱、アカバネ病、牛ウイルス性下痢症、牛痘、炭そ病、豚の病気で、豚コレラ、伝染性胃腸炎、豚パルボウイルスに有用である。

このブロッキング剤の効果により、非特異的な蛋白等の吸着を防ぐことが出来、より正確な診断が可能となるものである。

〔発明の効果〕

本発明によれば、PVAを用いることにより、腐敗せず、常温保存が可能で、オートクレーブ滅菌が出来、各種血清と非特異的吸着を起こさない優れた免疫アッセイ用ブロッキング剤を提供するものである。このPVAを用いることにより、血清診断、例えば鶏の病気の診断を正確に出来るようになる。

剤である第1表に示す各種のPVAを用いた。

第 1 表

PVA	重合度	鹼化度(%)	備 考
試料 1	500	98.5	
試料 2	2000	98.5	
試料 3	500	88	
試料 4	1000	88	
試料 5	2000	88	
試料 6	2400	88	
試料 7	1700	96	
試料 8		75~80	イタコン酸共重合物

PVAをPBS中の0.5%及び2.5%溶液とし、これら200 μ lを前記のようにして作製した抗原を固定したプレート及び抗原を固定していないプレートのウェルに加え、室温で30分放置した後に、液を捨てPBSで2回洗浄した。こうしてブロッキング剤でコートされたプレートを作製した。

血清の調製及び分析

鶏をマイコプラズマで免疫し、3週間後に採取

〔実施例〕

次に、本発明に係わる実施例を挙げるが、本発明の趣旨に反しない限り、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

抗原の調製及び固定化

マイコプラズマガリセプチカムC5PTを改変チャノック(CHANOCH)培地で3日間培養し、培養液を遠心分離(10000RPM)した。沈殿物を生理食塩水に懸濁しさらに遠心分離を行い洗浄した。この洗浄操作を3回行った。沈殿物を、培養液濃度の1/15濃度になるように磷酸緩衝液(PBS)に懸濁して抗原を調製した。この抗原を96穴マイクロプレートの各ウェルに50 μ lずつ加え、室温で2時間放置した後に、液を捨てPBSで2回洗浄して、抗原を固定したプレートを作製した。

他方、比較のため抗原を固定しないマイクロプレートも用意した。

ブロッキング剤によるプレートのコーティング

ブロッキング剤として、本発明のブロッキング

した血液から鶏免疫血清を調製した。他方、ふ化したての雛から採取した血液から非免疫血清を調製した。

前記ブロッキング剤でコーティングしたプレートの各ウェルにPBSで1/100に希釈した上記の血清(免疫血清又は非免疫血清)50 μ lを加え、30分間放置した。各ウェルから液を除き、PBSで3回洗浄した。

山羊抗鶏IgM抗血清(ICN社)を0.7%牛血清アルブミンを含むPBSで1/1000に希釈し、各ウェルに50 μ l加え、30分放置した後に、液を除き、PBSで3回洗浄した。西洋ワサビのペルオキシダーゼ標識抗山羊IgG(H+L)抗血清(キルケガード アンド ペリーラボラトリーズ社)を0.7%牛血清アルブミンを含むPBSで1/1000に希釈し、各ウェルに50 μ l加え、30分放置した後に、液を除き、ツイーン20を0.02%含むPBSで6回洗浄した。ABTS〔2, 2'-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム塩〕水溶液と過酸化水素水溶液を25 μ l

第 2 表

	ブロッッキング剤	濃度	非免疫血清 (鶏)		免疫血清 (免疫鶏)	
			抗原無し	抗原あり	抗原無し	抗原あり
比較例 1-1	アルブミン	0.7	0.08	0.12	0.67	1.07
1-2	乳タンパク質	0.7	0.26	0.36	0.93	1.19
実施例 1-1	試料 1	0.5	0.19	0.09	0.90	0.15
1-2	試料 2	0.5	0.00	0.01	0.06	0.08
1-3	試料 3	0.5	0.00	0.00	0.07	0.36
1-4	試料 4	0.5	0.00	0.05	0.07	0.58
1-5	試料 5	0.5	0.00	0.03	0.19	0.57
1-6	試料 6	0.5	0.00	0.03	0.08	0.55
1-7	試料 7	0.5	0.12	0.18	0.07	0.55
1-8	試料 8	0.5	0.02	0.02	0.16	0.31

ずつ各ウェルに加え室温で1時間放置した後、光度計にて405nm吸光度を測定した。この結果を第2表に示す。

比較例1

実施例1に記載したのと同様の操作を行った。但しブロッッキング剤としてPVAの代りに牛血清アルブミンのPBS中0.7%溶液及び乳タンパク質のPBS中0.7%溶液を用いた。この結果を第2表に示す。

抗原を固定しないプレートに各種のブロッッキング剤をコートし、さらにこれを免疫血清と反応させた場合、ブロッッキング剤としてアルブミン及び乳タンパク質を使用した場合それぞれ0.67及び0.93という高い吸光度を示し、他方本発明のブロッッキング剤である試料2～試料7を使用した場合、約0.1以下という低い吸光度を示した。これは、アルブミン又は乳タンパク質をコートした場合には免疫血清中に含まれる種々の抗体がアルブミン又は乳タンパク質に非特異的に結合した結果であり、他方、試料2～試料7を使用した場合には、これらが免疫血清中存在する種々の抗体と非特異的に結合しなかった結果であると考えられる。なお、試料1が高い吸光度を示したのは、この試料が高い親水性を有するために免疫血清中の種々の蛋白質と非特異的に結合したためと考えられる。

以上の結果から、分子量が低く且つ融解度が高いために親水性が特に高いものを除き、広範な種類のPVAが本発明において使用可能であることがわかる。

なお、雞から調製した非免疫血清を使用した場合、ブロッッキング剤としてアルブミン又は乳タンパク質を使用しても吸光度が低いのは、雞はまだ自らの抗体を産生していないため使用した非免疫血清中に非特異的に結合すべき抗体の含有量が少ないためと思われる。

第2表から明らかなように、従来の牛血清アルブミン又は乳タンパク質をブロッッキング剤として使用した場合、鶏の免疫血清は抗原をコートしないウェルにおいても高い吸光度を示すため、この系を用いて抗体価を測定することは不可能である。

実施例2

本発明のブロッッキング剤である種々のPVAを第3表に示す温度でPBSに希釈し、密封して室温で放置し、その外観の変化を観察した。この結果を次の第3表に示す。

比較例2

実施例2と同様の操作を行った。但し、被験物としてPVAの代りに牛血清アルブミンのPBS

中0.7%溶液を用いた。結果を第3表に示す。

第 3 表

	ブロッグ 剤	濃度 (%)	外 観		
			初 期	1 カ月後	6 カ月後
比較例 2-1	アルブ ミン	0.7	無色透明	沈澱形成	沈澱形成
実施例 2-1	試料 1	2.5	無色透明	沈澱形成	沈澱形成
2-2	試料 2	2.5	無色透明	無色透明	無色透明
2-3	試料 3	2.5	無色透明	無色透明	無色透明
2-4	試料 4	2.5	無色透明	無色透明	無色透明
2-5	試料 5	1.0	無色透明	無色透明	無色透明
2-6	試料 6	1.0	無色透明	無色透明	無色透明
2-7	試料 7	1.0	無色透明	無色透明	無色透明
2-8	試料 8	2.5	無色透明	無色透明	無色透明

用いたPVAは試料1を除き6カ月経過しても
 外観上の変化はみられなかった。他方、牛血清ア
 ルブミンは約1カ月経過後に沈澱の形成が見られ
 た。



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10114800 A**(43) Date of publication of application: **06.05.98**

(51) Int. Cl.

C07K 17/08
G01N 33/543
// C07K 16/00

(21) Application number: **08271126**(22) Date of filing: **14.10.96**

(71) Applicant: **NOF CORP NAKABAYASHI**
NORIO ISHIHARA KAZUHIKO
KAGAKU GIJUTSU SHINKO
JIGYODAN

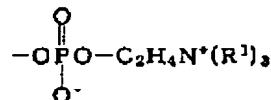
(72) Inventor: **SAKAKI HIDEJIRO**
SHIYUDOU KENSHIROU
YAMADA SATOSHI
MATSUYAMA KAZUO
NAKABAYASHI NORIO
ISHIHARA KAZUHIKO

(54) **POLYMER ADSORBED IMMUNOLOGICALLY**
ACTIVE SUBSTANCE IMMOBILIZING
STATIONARY PHASE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject solid phase useful for clinical diagnosis, capable of suppressing nonspecific adsorption and carrying out measurement excellent in sensitivity and reproducibility, by adsorbing a phosphorylcholine group-containing polymer on a stationary phase prepared by immobilizing an immunologically active substance to a carrier.

SOLUTION: A phosphorylcholine group-containing polymer of the formula (R¹ is a 1-10C hydrocarbon group) composed of a polymer obtained by polymerizing a polymerizable component containing 2-methacryloyloxyethyl-2'-(trimethyl ammonio)ethyl phosphate is adsorbed on an immunologically active substance immobilized stationary phase prepared by immobilizing an immunologically active substance (e.g. antibody) to a carrier (e.g. titer plate made of polystyrene) to give the objective polymer absorbing immunologically active substance immobilized stationary phase capable of carrying out measurement excellent in sensitivity and reproducibility while preventing nonspecific adsorption to an immunologically active substance-immobilized stationary phase useful in a two-site method (sandwich measurement) widely used in the field of clinical diagnostic.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-114800

(43)公開日 平成10年(1998)5月6日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 7 K 17/08

C 0 7 K 17/08

G 0 1 N 33/543

5 2 5

G 0 1 N 33/543

5 2 5 W

// C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 16/00

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 9 頁)

(21)出願番号

特願平8-271126

(22)出願日

平成8年(1996)10月14日

(71)出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(71)出願人 391012774

中林 宜男

千葉県松戸市小金原5丁目6番20号

(71)出願人 592057341

石原 一彦

東京都小平市上水本町3-16-37

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74)代理人 弁理士 酒井 一

最終頁に続く

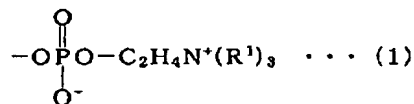
(54)【発明の名称】 重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相及びその用途

(57)【要約】

【課題】免疫学的活性物質の測定において、アイソトープ、酵素、蛍光物質、化学発光物質等の標識物質及び測定対象物質に限定されことなく、標識抗体の非特異的吸着、標識抗原の非特異的吸着あるいは検体中の蛋白質の固相への吸着等の蛋白質非特異的吸着を抑制して、優れた精度で目的物質を分析できる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、並びにこの固相を利用した各種方法を提供すること。

【解決手段】担体に免疫学的活性物質を固定化してなる免疫学的活性物質固定化固相に、式(1) (R¹: C1~10の炭化水素基)で示すホスホリルコリン基含有重合体を吸着させてなる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、並びにこの固相を用いた免疫学的活性物質の測定方法、非特異的吸着の防止方法及び固定化免疫学的活性物質の安定化方法。

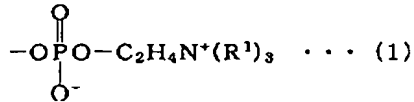
【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体に免疫学的活性物質を固定化してなる免疫学的活性物質固定化固相に、下記式(1)(式中、R¹は炭素数1～10の炭化水素基を示す)で表されるホスホリルコリン基含有重合体を吸着させてなる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相。

【化1】



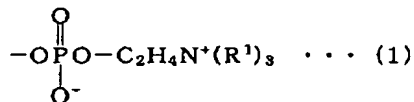
【請求項2】 請求項1記載のホスホリルコリン基含有重合体が、2-メタクリロイルオキシエチル-2'-(トリメチルアンモニオ)エチルホスフェートを含む重合成分を重合させた重合体である請求項1記載の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相。

【請求項3】 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、免疫学的活性物質固定化固相として、請求項1又は2記載の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることを特徴とする免疫学的活性物質

【請求項4】 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定において、標識抗体、標識抗原、検体中の蛋白質又はこれらの混合物が免疫学的活性物質固定化固相に非特異的に吸着することを防止するにあたり、免疫学的活性物質固定化固相として、請求項1又は2記載の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることを特徴とする非特異的吸着の防止方法。

【請求項5】 免疫学的活性物質固定化固相に固定化された免疫学的活性物質を安定化させるにあたり、担体に免疫学的活性物質を固定化させた後、下記式(1)(式中、R¹は炭素数1～10の炭化水素基を示す)で表されるホスホリルコリン基含有重合体を吸着させることを特徴とする固定化免疫学的活性物質の安定化方法。

【化2】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、免疫学的活性物質の測定方法、非特異的吸着の防止方法および固定化免疫学的活性物質の安定化方法に関する。更に詳しくは、臨床試薬等の分野で広く用いられているサンドイッチ法等において、標識抗体の抗体結合固相への吸着(標識抗体の非特異的吸着)、標識抗原の抗原結合固相への吸着(標識抗原の非特異的吸着)あるいは検体中の蛋白質の固相への吸着等の蛋白質が非特異的に吸着することを防止するに適する

重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相、さらにはそれを利用した免疫学的活性物質の測定方法、非特異的吸着の防止方法および固定化免疫学的活性物質の安定化方法に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床診断薬等の分野で広く使用されているイムノメトリックアッセイは、一般的にはtwo-site法(サンドイッチ測定法)による固相法が使われている。この測定方法は、測定すべき物質(被検物質; Ag)のエピトープを異にする2種類の抗体(Ab1, Ab2)を用いる。まず、合成高分子等からなる固相(SP)の表面にAb1を固定した後、これにAgを加えて結合させる。次いで、標識した抗体(Ab2*)を反応させた後、洗浄して遊離Ab2*を除去し、固相に結合したAb2*(結合型, B)の標準活性を測定する。この場合Ag量に応じてBが増加し、両者間に標準曲線が得られる。この標準曲線より検体中の抗原量を測定する。また、抗原と抗体とを逆にして、つまり標識抗原を用いて検体中の抗体量を測定する方法も用いられている(Ag1, Ag2*およびAbを用いて測定する)。これらの標識物質には、アイソトープ、酵素、蛍光物質あるいは発光物質等が用いられている。

【0003】これらサンドイッチ法の感度を左右する主な要因の1つは標識抗体の抗体結合固相への非特異的吸着あるいは標識抗原の抗原結合固相への非特異的吸着にある。こうした非特異的吸着は、標識に用いた標識物質の性質に依存し、例えば、酵素標識抗体の非特異的吸着の場合、アルカリフォスファターゼ標識抗体、グルコースオキシダーゼ標識抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体の非特異的吸着は、いずれも加えた量の30000万分の1であり、β-D-ガラクトシダーゼ標識抗体の非特異的吸着は2000分の1である(医学書院「酵素免疫測定法」第158～頁、1989年)。これらの非特異的吸着はサンドイッチ法における感度の低下および再現性の低下を起こしている。

【0004】従来、これら非特異的吸着を防止するために、次の(1)～(3)の方法が知られている。

(1)イムノアッセイをpH5～6の弱酸性の緩衝液で行なう方法、(2)Ab1を吸着させた後で、固相の余分な蛋白質結合部位を卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清、正常血清等を用いてブロックする方法、(3)有機酸を主成分とする緩衝液に乳蛋白質を溶解し、滅菌処理した非特異的吸着防止剤を用いる方法(特開平01-217266号公報)。しかしながら、(1)の弱酸性での操作や(2)や(3)の各種蛋白質でのブロックでは、その蛋白質非特異的吸着防止能は十分ではなく、臨床診断等の分野ではより優れた蛋白質非特異的吸着防止剤の開発および蛋白質非特異的吸着防止処理を施した、免疫学的活性物質固定化固相の開発が望まれている。また、市販の卵白アルブミン、ウシ血清アルブミ

ン、ウシ胎児血清、乳蛋白質等の蛋白質にはしばしば免疫グロブリン、酵素あるいはホルモン等の混入があり、反応に影響をあたえ分析値に誤差を生じさせるため問題となっている。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】本発明の第1の目的は、免疫学的活性物質の測定において、測定系に影響を与えず、つまりアイソトープ、酵素、蛍光物質あるいは化学発光物質等の標識物質および測定対象物質に限定されることなく、標識抗体の抗体結合固相への吸着（標識抗体の非特異的吸着）、標識抗原の抗原結合固相への吸着（標識抗原の非特異的吸着）あるいは検体中の蛋白質の固相への吸着等の蛋白質非特異的吸着を抑制して、優れた精度で目的物質を分析することのできる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を提供することにある。本発明の第2の目的は、蛋白質非特異的吸着を防止し、精度良く目的物質を分析することができる免疫学的活性物質の測定方法を提供することにある。本発明の第3の目的は、免疫学的活性物質を測定するにあたり、蛋白質非特異的吸着を十分に抑制しうる蛋白質非特異的吸着の防止方法を提供することにある。本発明の第4の目的は、免疫学的活性物質固定化固相に固定化された免疫学的活性物質を経時的に安定化しうる固定化免疫学的活性物質の安定化方法を提供することにある。

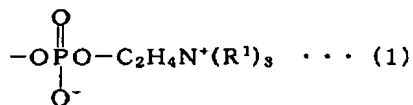
【0006】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、以下の(a)～(d)の発明が提供される。

(a) 担体に免疫学的活性物質を固定化してなる免疫学的活性物質固定化固相に、下記式(1)（式中、R¹は炭素数1～10の炭化水素基を示す）で表されるホスホリルコリン基含有重合体、好ましくは2-メタクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェートを含む重合成分を重合させた重合体等を吸着させてなる、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相。

【0007】

【化3】



【0008】(b) 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、免疫学的活性物質固定化固相として、前記重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることを特徴とする免疫学的活性物質の測定方法。

(c) 抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定において、標識抗体、標識抗原、検体中の蛋白質又はこれらの混合物が免疫学的活性物質固定化固相に非特異的に吸着することを防止するにあたり、免疫学的活性物質固定化固相として、前記重合体吸着免疫学的活性物質固定

化固相を用いることを特徴とする非特異的吸着の防止方法。

(d) 免疫学的活性物質固定化固相に固定化された免疫学的活性物質を安定化させるにあたり、担体に免疫学的活性物質を固定化させた後、前記式(1)で表されるホスホリルコリン基含有重合体を吸着させることを特徴とする固定化免疫学的活性物質の安定化方法。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相において、免疫学的活性物質固定化固相に固定化される免疫学的活性物質、あるいは該固相を用いて抗原抗体反応により免疫学的活性物質を測定する際の測定対象物である免疫学的活性物質は特に限定されるものではないが、例えば次の①～⑦のもの等が挙げられる。

①C反応性蛋白質(CRP)、リウマチ因子(RF)、トランスフェリン等の血漿蛋白質あるいはこれら血漿蛋白質に対する抗体、

②甲状腺刺激ホルモン(TSH)、トリヨードサイロニン(T3)、サイロキシシン(T4)、チロキシシン結合蛋白質(TBG)、サイログロブリン、インスリン、エストリオール(E3)、絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、ヒト胎盤性ラクトゲン(HPL)等のホルモンあるいはこれらホルモンに対する抗体、

③癌胎児性抗原(CEA)、β₂-ミクログロブリン、α-フェトプロテイン(AFP)等の腫瘍関連物質あるいはこれら腫瘍関連物質に対する抗体、

④HBs抗原、HBs抗体、HBe抗原、HBe抗体等のウイルス肝炎の抗原または抗体あるいは、これらウイルス肝炎の抗原または抗体に対する抗体または抗原、

⑤ムンプス、ヘルペス、麻疹、風疹、サイトメガロ等のウイルス、抗エイズ抗体等の各種生体成分に対する抗体または抗原、

⑥フェノバルビタール、アセトアミノフェノン、サリチル酸、シクロスポリン等の各種薬剤に対する抗体、

⑦酵素あるいは酵素に対する抗体。

なお、固定化される抗体に対する抗原、または固定化される抗原に対する抗体が、測定対象の免疫学的活性物質(被検物質)として使用できる。

【0010】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相において、担体の材質及び形状は特に限定されるものではないが、例えば材質としては、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、(メタ)アクリル樹脂、ポリメチルメタクリレート等の合成樹脂；ニトロセルロース、セルロース、メチルセルロース等のセルロース誘導体；金属、セラミック、ガラス、シリコンラバー等の無機物を挙げることができる。また、形状としては、例えば、試験管状、タイタープレート状、ラテックス状、フィルター状、フィルム状、微粒子状等を挙げることができる。

【0011】本発明において、免疫学的活性物質固定化固相に吸着させるホスホリルコリン（以下、PCと略す）基含有重合体は、前記式（1）で示されるPC基を有する重合体であって、PC基を有する単量体を含む重合成分を重合させた重合体である。PC基を有する単量体としては、例えば、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリエチルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリプロピルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリブチルアンモニオ）エチルホスフェート、2-（メタ）アクリロイルオキシエチル-2'-（トリオクチルアンモニオ）エチルホスフェート等が挙げられる。特に入手性等の点から、2-メタアクリロイルオキシエチル-2'-（トリメチルアンモニオ）エチルホスフェート〔=2-メタアクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下、MPCと略す）〕が好ましく挙げられる。本発明で用いるPC基含有重合体は、PC基を有する単量体の単重重合体であっても、PC基を有する単量体と他の共重合可能なビニル単量体との共重合体でもよい。PC基含有重合体中のPC基含有割合は、PC基含有重合体に対し、1~100モル%が好ましく、特に5~10モル%が好ましい。含有割合が1モル%未満の場合には、非特異的吸着を防止することが困難になるので好ましくない。またPC基含有重合体は、重合温度、重合開始剤使用量、重合度調整剤の使用等によっても異なるが、好ましくは数平均分子量（Mn）1,000~1,000,000、特に好ましくは2,000~500,000の重合体である。

【0012】前記PC基を有する単量体と共重合可能な他のビニル単量体としては、例えば、（メタ）アクリル酸メチル、（メタ）アクリル酸エチル、（メタ）アクリル酸-n-ブチル、（メタ）アクリル酸イソブチル、

（メタ）アクリル酸ペンチル、（メタ）アクリル酸ヘキシル、（メタ）アクリル酸ヘプチル、（メタ）アクリル酸オクチル、（メタ）アクリル酸トリデシル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等の（メタ）アクリル酸エステル；（メタ）アクリレート；スチレン、 α -メチルスチレン、メチル核置換スチレン、クロロ核置換スチレン等のスチレン系単量体；塩化ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、プロピレン、イソブチレン等の置換、もしくは無置換炭化水素系単量体、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体；エチルビニルエーテル、n-ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；ジエチルイタコネート、ジ-n-ブチルイタコネート等が挙げられる。特に好ましくは、メタアクリル酸エステル、スチレン等を好ましく挙げることができる。

【0013】PC基含有重合体を調製するには、前述の

PC基を有する単量体を含む重合成分を、例えば重合開始剤を用いたラジカル重合等の通常の重合方法により重合させることにより得ることができる。

【0014】重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤であれば特に限定されず、例えば2,2'-アゾビスイソプロピロニトリル、過酸化ベンゾイル、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、t-ブチルペルオキシ-2-エチルヘキサノエート、t-ブチルペルオキシピバレート、t-ブチルペルオキシジイソプロチレート、過硫酸塩、過硫酸-亜硫酸水素塩等が挙げられる。重合開始剤の使用量は、用いる全単量体100重量部に対して0.01~10重量部が好ましく、特に好ましくは0.1~5重量部である。

【0015】重合条件は、好ましくは30~80℃、特に好ましくは40~70℃において2~72時間重合させるのが望ましい。この際、重合反応をより円滑に行なうために溶媒を用いてもよく、該溶媒としては、水、メタノール、エタノール、プロパノール、t-ブタノール、ベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、クロロホルムおよびこれらの混合物等を挙げることができる。

【0016】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を調製するには、前記担体に免疫学的活性物質を、例えばインキュベート等により固定化させた免疫学的活性物質固定化固相に、前記PC基含有重合体を含む溶液を添加等して、PC基含有重合体を吸着させる方法等によりえることができる。PC基含有重合体を含む溶液は、懸濁液であっても溶液であってもよく、好ましくはリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、各種生理食塩水等の溶解液あるいは懸濁液が挙げられる。これらの液にジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド等の有機溶媒を0.01~20重量%添加することもできる。特に好ましくはリン酸緩衝液、各種生理食塩水等の溶解液が挙げられる。PC基含有重合体を含む溶液中のPC基含有重合体の濃度は、好ましくは0.00001~10重量%であり、特に、蛋白質の固相への非特異的吸着を防止し、且つ固定化免疫学的活性物質の安定化能を著しく向上させるように、0.0001~5重量%が好ましい。PC基含有重合体を免疫学的活性物質固定化固相に吸着させるには、担体表面に免疫学的活性物質を結合させた後、前記PC基含有重合体を含む溶液を添加してそのまま保持あるいは、添加後にある所定の時間インキュベートし、続いて残存のPC基含有重合体を含む溶液を除去することにより行うことができる。PC基含有重合体を含む溶液を添加してから除去するまでのインキュベート時間は、PC基含有重合体を含む溶液の濃度あるいはインキュベート温度等にもよるが、1分間~72時間が好ましい。特に、抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、蛋白質の固相への非特異的吸

着を十分に防止する効果を付与し、また固相化された免疫学的活性物質の安定化効果を向上させるために、30分間～48時間が好ましい。インキュベート時間が1分未満では、所望の効果が得られない恐れがある。インキュベート温度は、好ましくは0～55℃、特に、固定化免疫学的活性物質の免疫学的活性に影響のない、4～40℃が好ましい。PC基含有重合体の固相への吸着量は、特に限定されるものではないが、好ましくは10ng/48ウェル～10000ng/48ウェル、特に好ましくは、固定化免疫学的活性物質の安定化に寄与し、添加する重合体溶液の粘性も低く扱い易い、100ng/48ウェル～1000ng/48ウェルが挙げられる。10ng/48ウェル未満では、固定化免疫学的活性物質の安定化が不十分になる恐れがあり、10000ng/48ウェルを超えると、添加する重合体溶液の濃度を高くするか、或いは重合体溶液を添加してから除去するまでの時間を長くする必要がある。重合体溶液の濃度を高くすると粘性も高くなり扱い難くなり、時間を長くすると迅速な測定が困難になり好ましくない。

【0017】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相は、PC基含有重合体が吸着されているので、保存時の固定化された免疫学的活性物質の安定性が良好である。このようにして調製された重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の保存方法は特に限定されないが、好ましくは、そのまま放置、密封、凍結、あるいは凍結乾燥後に密封等が挙げられ、特に好ましくは、固定化免疫学的活性物質の安定化効果を更に向上させるために、密封あるいは凍結乾燥後に密封して保存するのが望ましい。

【0018】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相は、あらゆる分野、方法で利用可能であり、例えば臨床検査、免疫学、生化学、分子生物学等の研究分野で利用可能であり、特に、酵素免疫測定法(ELISA)、放射線免疫測定法(RIA)、あるいはウエスタンブロッティング法等の免疫学的測定方法に多用することができる。

【0019】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の具体的な調製方法及び、抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質測定方法を、例えば、担体としてポリスチレン製タイタープレートを用いた場合について以下に説明する。

【0020】(1)まず最初に、測定対象物と特異的に反応する抗体を含む溶液をポリスチレン製タイタープレートに加え、4℃、12時間等の所望条件でインキュベートした後、生理食塩水で数回洗浄し、免疫学的活性物質固定化固相を調製する。

(2)次に、MPC重合体等のPC基含有重合体を0.01重量%含む溶液を前記免疫学的活性物質固定化固相に添加し、4℃、12時間等の所望条件でインキュベートした後、PC基含有重合体を含む溶液を除去し、重合体

吸着免疫学的活性物質固定化固相を調製する。

(3)続いて、濃度が既知の測定対象物を含む溶液(スタンダード溶液)と、未知量の測定対象物を含む溶液(検体)とを各々別に加え、25℃、2時間等の所定条件でインキュベートして、固定化免疫学的活性物質と測定対象物とを抗原抗体反応させることにより、固定化免疫学的活性物質-測定対象物複合体を形成させ、その後、生理食塩水で数回洗浄する。

(4)測定対象物と特異的に反応する酵素標識抗体を含む溶液を加え、25℃、2時間等の所望条件でインキュベートして、測定対象物と酵素標識抗体とを抗原抗体反応させることにより、固定化免疫学的活性物質-測定対象物-酵素標識抗体複合体を形成させ、その後、生理食塩水で数回洗浄する。

(5)固定化免疫学的活性物質-測定対象物-酵素標識抗体複合体の酵素活性を測定し、検体での酵素活性をスタンダード溶液での酵素活性と比較することにより、検体中の測定対象物量を求めることができる。このような測定方法において、PC基含有重合体が吸着された重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることにより、蛋白質の固相への非特異的吸着が防止される。

【0021】

【発明の効果】本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相は、酵素、ホルモン等の混入がないPC基含有重合体が吸着されているので、抗原抗体反応を用いる免疫学的活性物質の測定方法において、蛋白質の非特異的吸着が低い。また、固定化された免疫学的活性物質が長期間安定であり、高感度で精度の高い分析の実施が可能となる。

【0022】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

合成例1：MPC重合体の合成

総単量体濃度が1.0mol/lおよび重合開始剤量が単量体に対して1mol%となるように、MPC5.905g(0.02mol)を重合用ガラス反応管に秤取し、これに重合開始剤として2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(以下AIBNと略す)0.0328g(0.2mmol)、並びに重合溶媒としてメタノール20mlを加えた。反応管内を十分にアルゴン置換した後、密封した。次いで、24時間、50℃に加温することにより重合反応を行なった。反応混合物を氷冷した後、400mlのジエチルエーテルに滴下することにより重合物を沈澱させた。沈澱物を濾別し、十分にジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥して白色粉末状の重合物(重合体Aと称す)を3.691g得た。重合体の収率は62.5%であった。分子量は重合物のリン酸緩衝溶液液をGPC(ゲルパーミエーションクロマトグラフィー)を用いて分析することにより測定した結果、ポリエチレングリコール換算で68000であった。

【0023】合成例2：MPC-メタクリル酸-n-ブチル（以下BMAと略す）共重合体の合成

MPCとBMAとのモノマー仕込みモル比がMPC/BMA=40/60、総単量体濃度が1.0mol/l、並びに重合開始剤量が単量体に対して1mol%となるように、MPC1.435g(4.9mmol)、BMA2.153g(15.1mmol)を重合用ガラス反応管に秤取し、これに重合開始剤としてAIBN0.0328g(0.2mmol)、並びに重合溶媒としてメタノール20mlを加えた。反応管内を十分にアルゴン置換した後、密封した。次いで、24時間、60℃に加温することにより、重合反応を行なった。反応混合物を氷冷した後、400mlのジエチルエーテルに滴下することにより重合物を沈澱させた。沈澱物を濾別し、十分にジエチルエーテルで洗浄した後、減圧乾燥して白色粉末状の重合物（以下重合体Bと称す）を2.019g得た。重合体の収率は、65.3%であった。分子量は重合物のテトラヒドロフラン溶液をGPCを用いて分析することにより測定した結果、ポリスチレン換算で32000であった。モル組成比は元素分析の結果より、MPC/BMA=38.5/61.5であった。

【0024】合成例3

* BMAの代わりにメチルメタクリレート（MMAと略す）を用い、合成例2に準じて共重合体（以下重合体Cと称す）を合成した。得られた共重合体のモル組成および分子量は、MPC/MMA=34.4/65.6、Mn=69000であった。

【0025】合成例4

BMAの代わりにスチレン（以下Stと略す）を用い、合成例2に準じて共重合体（重合体Dとする）を合成した。得られた共重合体のモル組成および分子量は、MPC/St=38.5/61.5、Mn=26000であった。

【0026】合成例5

BMAの代わりに2-ヒドロキシエチルメチルメタクリレート（以下HEMAと略す）を用い、合成例2に準じて共重合体（以下重合体Eと称す）を合成した。得られた共重合体のモル組成および分子量は、MPC/HEMA=21.5/78.5、Mn=32000であった。

【0027】合成例1～5に用いた単量体、得られた共重合体の重合体の収率、モル組成及び分子量を表1に示す。

【0028】

【表1】

	合 成 例				
	1 重合体A	2 重合体B	3 重合体C	4 重合体D	5 重合体E
式(1)の基含有単量体	MPC	MPC	MPC	MPC	MPC
その他の単量体	—	BMA	MMA	St	HEMA
仕込みモル比 MPC/その他の単量体	100/0	40/60	40/60	40/60	40/60
重合体の収率(%)	62.5	65.3	66.0	63.5	66.0
数平均分子量	68000	32000	69000	26000	32000
重合モル比 MPC/その他の単量体	100/0	38.5/61.5	34.4/65.6	38.5/61.5	21.5/78.5

【0029】実施例1-1：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

10μl/mlの抗マウス抗体生理食塩水溶液（和光純薬工業（株）製）をポリスチレン製タイタープレートに100μl/ウェルで加え、4℃、一晚インキュベートして物理的に吸着させた後に、生理食塩水溶液で4回洗浄を行った。次いで、合成例2で合成した重合体B0.001重量%添加した生理食塩水溶液を300μl/ウェルで加え、4℃、一晚インキュベートした後に、共重合体溶液を除去し、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を調製した。吸着により固定化された抗マウス抗体量は、ポリスチレン製タイタープレートの10ウェルに200μlの1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む生理食塩水を各々添加して、固定化抗マウス抗体を剥離させた後、PIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Kit」を用いて測定した。測定結果を表2に示す。また、吸着した重合体量は、48ウェルを用いて和光純薬工業（株）製の商品名「リン脂質B-テストワコー」を用いて測定した。測定

結果を表3に示す。

【0030】実施例1-2及び1-3：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

合成例2で合成した重合体Bの代わりに、合成例3及び4で合成した重合体C及びDを用いた以外は実施例1-1と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得、各測定を行った。結果を表2及び表3に示す。

【0031】比較例1-1

合成例2で合成した重合体Bの代わりに、1重量%のウシ血清アルブミンを用いた以外は実施例1-1と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得た。吸着により固定化された抗マウス抗体量は、実施例1-1と同様に、吸着したウシ血清アルブミン量は、抗マウス抗体量を測定するのと同様に、10ウェルに200μlの1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む生理食塩水を各々添加して、固定化抗マウス抗体及びウシ血清アルブミンを剥離させた後、PIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Kit」を用いて吸着蛋白質量を求め、その値から固定化された抗マ

ウス抗体量を差し引くことにより求めた。結果を表2及び表3に示す。

【0032】実施例1-4：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

ガラス試験管（径：12mm、高さ：75mm）に3-アミノプロピルトリエトキシシランを0.5mlを加え、室温で20分間インキュベートした後に、生理食塩水で4回洗浄した。次に、2.5重量%-グルタルアルデヒドを含む生理食塩水を0.5ml加え、室温で2時間インキュベートした後に、生理食塩水で2回洗浄した。次に、10 μ l/mlの抗マウス抗体（和光純薬工業（株）製の生理食塩水溶液を0.5ml加え、室温で2時間インキュベートした後に、生理食塩水溶液で4回洗浄を行った。次いで合成例1で合成した重合体Aを0.01重量%添加した生理食塩水溶液を1ml加え、室温で30分間インキュベートした後に、重合体溶液を除去し、重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得た。固定化された抗マウス抗体量は、未反応の抗マウス抗体を、PIERCE社製の商品名「Micro BCA Protein Assay Kit」を用いて測定し、添加した全抗マウス抗体量と未反応の抗マウス抗*

* 体量との差から求めた。測定結果を表2に示す。また、吸着したMPC重合体量は、試験管20本を用いて和光純薬工業（株）製の商品名「リン脂質B-テストワーク」を用いて測定した。測定結果を表3に示す。

【0033】実施例1-5：重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の調製

実施例1-4で用いた重合体Aの代わりに、合成例5で合成した重合体Eを用いた以外は実施例1-4と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得、各測定を行った。測定結果を表2及び表3に示す。

【0034】比較例1-2

実施例1-4で用いた重合体Aの代わりに、1重量%のウシ血清アルブミンを用いた以外は実施例1-4と同様に重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を得た。固体化された抗マウス抗体量は実施例1-4と同様に、ウシ血清アルブミン量は、添加したウシ血清アルブミン量と未吸着のウシ血清アルブミン量との差から求めた。測定結果を表2及び表3に示す。

【0035】

【表2】

実 施 例			比較例	実 施 例			比較例
1-1	1-2	1-3	1-1	1-4	1-5	1-2	1-2
2.6	2.6	2.6	2.6	2.1	2.1	2.1	2.1

注1)：実施例1-1～1-3及び比較例1-1の単位は μ g/ cm^2 ・10ウェル
(10ウェル分の単位 cm^2 当たりの固定化量)

注2)：実施例1-4、1-5及び比較例1-2の単位は μ g/ cm^2 ・10本
(試験管10本分の単位 cm^2 当たりの固定化量)

【表3】

実 施 例			比較例	実 施 例			比較例
1-1	1-2	1-3	1-1	1-4	1-5	1-2	1-2
765	762	760	600	610	600	610	610

単位はng/48ウェル

【0037】実施例2-1～2-3：測定対象物の測定
実施例1-1、実施例1-2及び実施例1-3で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相に、0 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.2 μ g/ml、0.4 μ g/ml、0.8 μ g/mlの各濃度のマウス抗体（和光純薬工業（株）製の生理食塩水溶液を100 μ l/ウェル添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体（和光純薬工業（株）製）を生理食塩水で10000倍に希釈して、100 μ l/ウェル添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、和光純薬工業（株）製の商品名「OPD錠」（オーフェミレンジアミン）1錠を0.006重量%の過酸化水素を含むリン酸/クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液を、50 μ l/ウェル添加した後、25℃、10分間インキュベートし、続いて2Nの硫酸溶液を100 μ l/ウェル加えた後に、東ソー社製のマ

イクロプレートリーダー「MPR-A41」（商品名）を用いて、各ウェルの492nmの吸光度を測定した。測定個数（n）は8で、平均値、標準偏差及び、CV値（%）{（平均値/標準偏差） \times 100}を表4に示す。

【0038】実施例2-4及び2-5：測定対象物の測定

実施例1-4及び実施例1-5で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相に、0 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.2 μ g/ml、0.4 μ g/ml、0.8 μ g/mlの各濃度のマウス抗体生理食塩水溶液（和光純薬工業（株）製）0.5mlを試験管に添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体（和光純薬工業（株）製）を生理食塩水で20000倍に希釈し、0.5ml試験管に添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、和

光純薬工業（株）製の商品名「OPD錠」1錠を0.02%の過酸化水素を含むリン酸／クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液0.5mlを試験管に添加した後、25℃、10分間インキュベートした。続いて、2Nの硫酸溶液0.5mlを試験管に添加した後に、日本分光社製分光光度計、商品名「Ubest-50」を用いて、各試験管の492nmの吸光度を測定した。測定個数（n）は5で、平均値、標準偏差及び、CV値（%）を表4に示す。

【0039】比較例2-1

実施例2-1で用いた、実施例1-1で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1*

*-1で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以外は実施例2-1と同様に行い、各測定を行った。測定結果を表5に示す。

【0040】比較例2-2

実施例2-4で用いた、実施例1-4で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1-2で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以外は実施例2-4と同様に行い、各測定を行った。測定結果を表5に示す。

10 【0041】

【表4】

抗体 量 μg /ml	实 施 例														
	2-1			2-2			2-3			2-4			2-5		
	吸光度	標 準 偏 差	CV (%)	吸光度	標 準 偏 差	CV (%)	吸光度	標 準 偏 差	CV (%)	吸光度	標 準 偏 差	CV (%)	吸光度	標 準 偏 差	CV (%)
0.00	0.050	0.0042	8.4	0.048	0.0042	8.8	0.049	0.0039	8.0	0.033	0.0012	3.6	0.029	0.0018	6.2
0.05	0.510	0.0408	8.0	0.485	0.0398	8.2	0.497	0.0397	8.0	0.235	0.0128	5.5	0.254	0.0162	6.4
0.10	0.789	0.0564	7.1	0.750	0.0458	6.1	0.769	0.0615	8.0	0.363	0.0191	5.3	0.426	0.0276	6.5
0.20	1.206	0.0732	6.1	1.146	0.0696	6.1	1.176	0.0945	8.0	0.555	0.0382	6.9	0.641	0.0416	6.5
0.40	1.604	0.0945	5.9	1.524	0.0876	5.7	1.564	0.1268	8.1	0.738	0.0527	7.1	0.839	0.0527	6.3
0.80	1.812	0.0984	5.4	1.721	0.0993	5.8	1.767	0.1234	7.0	0.834	0.0533	6.4	0.958	0.0593	6.2

【0042】

【表5】

抗体量 μg/ml	比 較 例					
	2-1			2-2		
	吸光度	標準偏差	CV (%)	吸光度	標準偏差	CV (%)
0.00	0.393	0.0412	10.5	0.197	0.0310	15.8
0.05	0.486	0.0486	10.0	0.243	0.0231	9.5
0.10	0.575	0.0687	11.9	0.288	0.0252	8.8
0.20	1.096	0.0946	8.6	0.548	0.0438	8.0
0.40	1.534	0.0626	4.1	0.767	0.0328	4.3
0.80	1.747	0.0804	4.6	0.747	0.0351	4.0

【0043】実施例3-1～3-3：安定性試験

実施例1-1、実施例1-2及び、実施例1-3で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相をアルミラミネートポリエチレン袋に密封した後に、40℃で保存した。0日後（試験開始日）、1週間後、2週間後、3週間後及び、4週間後に、1μg/mlのマウス抗体生理食塩水溶液を50μl/ウェル添加し、25℃、2時間インキュベートした後、生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体（和光純薬工業（株）製）を生理食塩水で10000倍に希釈し、100μl/ウェル添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次に和光純薬工業（株）製の商品名「OPD錠」1錠を0.006%の過酸化水素を含むリン酸／クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液を、100μl/ウェル添加した後、25℃、10分間インキュベートした。次いで、2Nの硫酸溶液を100μl/ウェル加えた後

に、東ソー社製マイクロプレートリーダー「MPR-A41」（商品名）を用いて、各ウェルの492nmの吸光度を測定し、0日後の吸光度を100%として、各週間後の%を求めた。測定結果を表6に示す。

【0044】実施例3-4及び3-5：安定性試験

実施例1-4及び実施例1-5で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を密封した後に、40℃で保存した。0日後（試験開始日）、1週間後、2週間後、3週間後及び4週間後に、1μg/mlのマウス抗体生理食塩水溶液（和光純薬工業（株）製）0.5mlを試験管に添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて生理食塩水で4回洗浄した。次いで、パーオキシダーゼ標識-抗マウス抗体-抗体（和光純薬工業（株）製）を生理食塩水で20000倍に希釈し、0.5mlを試験管に添加した後、25℃、2時間インキュベートし、続いて、生理食塩水で4回洗浄した。和光純薬工業（株）製の商品名「OPD錠」1錠を0.006%の過酸化水素を含むリン酸／クエン酸緩衝液12mlに溶解した溶液0.5mlを試験管に添加した後、25℃、10分間インキュベートして、2Nの硫酸溶液0.5mlを試験管に添加した後、日本分光社製分光光度計、商品名「Ubest-50」を用いて、各試験管の492nmの吸光度を測定し、0日後の吸光度を100%として、各週間後の%を求めた。測定結果を表6に示す。

【0045】比較例3-1

実施例3-1で用いた、実施例1-1で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1-1で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以

外は実施例3-1と同様に測定を行った。測定結果を表6に示す。

【0046】比較例3-2

実施例3-4で用いた、実施例1-4で調製した重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の代わりに、比較例1*

	実 施 例					比 較 例	
	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-1	3-2
0日後	100	100	100	100	100	100	100
1週間後	100	102.2	99.8	101.5	100.9	95.4	93.2
2週間後	98.6	99.8	102.2	109.4	99.1	82.3	81.9
3週間後	104.2	103.6	98.6	99.6	103.5	64.3	62.8
4週間後	99.6	103.6	105.2	105.2	98.6	41.9	38.2

【0048】以上の結果、本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相を用いることにより、表2の結果から、固定化固相に抗マウス抗体が固定化されていることが判り、また表3の結果から、その後吸着された、本発明の重合体及び比較例のBSAが量600～765ng※

*-2で調製した免疫学的活性物質固定化固相を用いた以外は実施例3-4と同様に測定を行った。測定結果を表6に示す。

【0047】

【表6】

※/48ウェル吸着されていることが判る。更に、表4及び表5の結果から、より低濃度の抗体量でも、感度良く測定が可能であること、また、表6より、本発明の重合体吸着免疫学的活性物質固定化固相の場合、固定化された免疫学的活性物質の安定性が優れていることが判る。

フロントページの続き

(72)発明者 榊 秀次郎
茨城県つくば市春日2-20-3
(72)発明者 首藤 健志郎
茨城県つくば市花畑3-7-1
(72)発明者 山田 智
茨城県つくば市春日2-20-3

★(72)発明者 松山 一夫
茨城県つくば市春日2-17-14
(72)発明者 中林 宣男
千葉県松戸市小金原5-6-20
(72)発明者 石原 一彦
東京都小平市上水本町3-16-37

★